第 38 卷第 9 期
2018 年 5 月

生 态 学 报
ACTA ECOLOGICA SINICA

Vol.38,No.9
May,2018

DOI: 10.5846/stxb201704030572
薛阁,李洋,陈劲松,宋会兴.克隆整合对遮荫白夹竹分株根际土壤细菌生物特征的影响.生态学报,2018,38(9):3132-3144.
Xue G, Li Y, Chen J S, Song H X. Effect of clonal integration on soil microbial properties in the rhizosphere of *Phyllostachys bissetii*, subjected to heterogeneous light. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(9):3132-3144.

克隆整合对遮荫白夹竹分株根际土壤细菌生物特征的影响

薛 阁[1],李 洋[1],陈劲松[2],宋会兴[1,*]
1 四川农业大学风景园林学院, 成都 611130
2 四川师范大学生命科学学院, 成都 610101

摘要:克隆整合被认为是克隆植物维持生态优势的重要手段,其通过分株间生理整合缓解资源异质性带来的压力。文章以根状茎克隆植物白夹竹(*Phyllostachys bissetii*)为研究对象,探讨异质性光照下克隆整合对白夹竹分株根际土壤细菌生物特征的影响。白夹竹克隆片段包含一个近端分株(proximal ramet)和一个远端分株(distal ramet),近端分株或远端分株分别置于 80%遮荫环境,另一分株置于全光照环境;同时,分株间根状茎保持连接或割断处理。研究结果表明,不论白夹竹克隆片段近端分株遮荫还是远端分株遮荫,克隆整合均显著促进了遮荫分株根际土壤溶解性有机碳(DOC)含量和微生物生物量碳、氮含量(MBC, MBN);根状茎连接条件下遮荫分株根际土壤胞外 N-乙酰基-β-氨基葡萄糖苷酶(NAGase)、脲酶(Urease)活性显著高于根状茎割断处理的遮荫分株;对遮荫分株根际土壤基因组 DNA 的 16S rDNA V3、V4 可变区的测序结果表明,可操作分类单元(OTUs)归于 13 个门,415 个属。与根际土壤氮素转化相关的菌群 *Nitrosomonadaceae*(uncultured), *Nitrospira*, *Nitrospinaceae*(uncultured), *Xanthobacteraceae*(uncultured), *Bradyrhizobium* 相对丰度较小(最高值为 11.8%)。基于 OTUs 的主成分分析(PCA)表明,根状茎割断处理并没有对遮荫分株根际土壤细菌生物群落结构产生显著性影响。克隆整合显著促进了遮荫分株根际土壤 C 有效性,进而刺激了微生物调控的土壤有机质(SOM)周转过程。克隆整合对异质生境下克隆植物土壤细菌生物特征的影响可能部分解释了克隆植物的生态优势。
关键词:克隆整合;根际土壤;高通量测序;细菌生物群落结构;功能冗余

Effect of clonal integration on soil microbial properties in the rhizosphere of *Phyllostachys bissetii*, subjected to heterogeneous light

XUE Ge[1], LI Yang[1], CHEN Jingsong[2], SONG Huixing[1,*]
1 *College of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Chengdu* 611130, *China*
2 *College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu* 610101, *China*

Abstract: Clonal integration plays an important role for clonal plants during adaptation to heterogeneous habitats, by enhancing the survival of clonal fragments, thus, improving growth performance. An *in-situ* experiment was conducted using a clonal fragment of *Phyllostachys bissetii* with two successive ramets. We focused on microbial properties in the rhizosphere soil of shaded, distal, or proximal ramet. Shading (80% shading) was applied to distal or proximal ramets, respectively, whereas counterparts were placed in full sunlight. The rhizome between two successive ramets was either severed or retained intact. In present study, dissolved organic carbon (DOC), microbial biomass, and two extracellular enzymes (N-acetyl-β-D-glucosaminidase, urease) were investigated in the rhizosphere soil of shaded distal and proximal ramets. The composition

基金项目:国家自然科学基金项目(31470636);长江上游生态安全协同创新中心开放基金项目
收稿日期:2017-04-03; **网络出版日期:**2018-01-26
* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: Huixingsong@ aliyun.com

of the soil microbial community in the rhizosphere of shaded distal and proximal ramets was confirmed. The key results of this study are as follows: DOC in the rhizosphere soil of shaded distal or proximal ramets was significantly increased by clonal integration. Furthermore, increased microbial biomass carbon and nitrogen (MBC, MBN) were observed in the rhizosphere soil of shaded distal and proximal ramets. Clonal integration significantly enhanced the activities of N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGase) and urease in the rhizosphere soil of shaded distal and proximal ramets. A total of 556519 reads and 18898 OTUs were obtained from the 12 soil samples through Illumina Miseq sequencing. The bacterial OTUs were assigned into 13 different phyla and 415 genera. *Nitrosomonadaceae*(uncultured), *Nitrospira*, *Nitrospinaceae*(uncultured), *Xanthobacteraceae*(uncultured), *Bradyrhizobium* were associated with soil N cycling, with low relative abundance. The results of principal component analysis revealed that the effect of clonal integration on the composition of the soil microbial community in the rhizosphere of shaded distal and proximal ramets were not significant, sharing similar microbial diversity at the OTU level. In summary, C availability and soil microbial biomass were significantly increased by clonal integration in the rhizosphere soil of shaded distal and proximal ramets and further stimulated the turnover of soil organic matter mediated by soil microbes in the rhizosphere. We tentatively conclude that the effect of clonal integration on soil microbial properties in the rhizosphere soil may partly explain the important ecological advantage of clonal plants, especially the species subjected to heterogeneous light habitats.

Key Words: clonal integration; rhizosphere soil; Illumina Miseq sequence; microbial community composition; functional redundancy

由于克隆生长,同一克隆片段内的分株通过匍匐茎、根状茎等水平结构连接在一起,并且相连分株间存在物质传递(如光合产物、水分、养分等),这被称为克隆整合(clonal integration)[1]。对光合产物、矿质养分、水分等物质的克隆整合格局同位素示踪以及染料标记等的研究结果表明,同化产物在克隆片段内既可以顶向传输(acropetal transport),即流向远端分株(distal ramet);也可以基向传输(basipetal transport),即流向近端分株(proximal ramet)[2]。因此,克隆整合可能是克隆植物维持生态优势的重要手段,其通过分株间生理整合缓解资源异质性(光照等)带来的压力。

释放到根际环境中的植物根系分泌物被认为是投入到土壤中易分解碳最主要的来源[3]。这些易分解的有机质成为异养根际微生物重要的能量来源、结构物质,能够促进根系微生物的快速生长和繁殖[4]。土壤有机质矿化作用是受土壤酶催化的复杂生物化学过程,这其中土壤酶主要来源于土壤微生物[5-6]。土壤微生物代谢活动产生的酶类,一部分参与自身生理代谢,另一部分通过排泄或分泌到土壤基质中,被认为是为土壤微生物活性的敏感指示[7]。因此,根际生态过程(如有机质降解等)及养分有效性可能受到土壤微生物活性及其群落结构变化的影响。

土壤是一个复杂的、动态变化的系统,关于土壤代谢过程(有机质降解、硝化过程、土壤呼吸等)以及特定土壤酶活性(脲酶、蛋白酶、木质素酶等)的研究,间接揭示了土壤微生物在生态系统养分循环中的重要作用[8]。土壤微生物群落结构主要由群落的种类和种间差异来描述。土壤微生物通常种类繁多、数量巨大,加之土壤介质本身的复杂多变,传统的分离培养方法仅仅能筛选出极少数的土壤微生物(1%—10%),而绝大多数土壤微生物在实验室条件下难以培养、鉴定[9]。20 世纪 90 年代以来,DNA 测序技术快速发展并在分子生态学上得到广泛应用,16S rDNA 测序被越来越多的研究人员应用于环境中细菌的群落结构分析[10-11]。本研究中,我们采集白夹竹遮荫分株(近端分株,远端分株)的根际土壤,对溶解性有机碳、微生物生物量、土壤酶活性进行测定以研究克隆整合对异质性光照下白夹竹分株根际土壤生物过程的影响;同时,提取根际土壤基因组 DNA,进行 16S rDNA 测序来研究分株间资源共享对异质性光照下白夹竹分株根际土壤的细菌群落结构的影响。

1　材料与方法

1.1　实验材料

白夹竹(*Phyllostachys bissetii*)又称蓉城竹、四川刚竹,是禾本科(Gramineae)刚竹属(*Phyllostachys*)小型竹种,竿高 3—6m,粗约 2cm,它通过地下根状茎(竹鞭,rhizome)在水平空间拓展,是典型的克隆植物。产浙江、四川,竿作柄材或篾用,笋食用,同时是大熊猫的主食竹之一。

1.2　实验设计

实验样地位于四川省邛崃市南宝山镇(103°14′14″E, 30°14′31″N),海拔 1217m,年均温 16.3℃,年降雨量 1117.3mm。2015 年 12 月,选择地势较为平缓的白夹竹纯林作为实验处理区域。选择分株大小、竹鞭间距一致的白夹竹克隆片段(包含通过竹鞭相连的白夹竹分株),分别标记近端分株和远端分株。

整个实验包含两个处理组:顶向处理组,即克隆片段中远端分株处于 80%遮荫状态,近端分株处于正常光照;基向处理组,即克隆片段中近端分株处于 80%遮荫状态,远端分株处于正常光照。分株间的根状茎处于割断或连接处理。实验过程采取如下处理,以排除外界土壤对遮荫分株根际生态过程的影响:以白夹竹分株竿基部为中心(50cm×50cm)进行挖沟,深度 50cm,之后对分株根部土块周围包裹聚乙烯膜和 PVC 板材。聚乙烯膜和 PVC 板材主要用于防止外部土壤环境中水分、养分渗入到白夹竹分株根部土块中。同时,分株根部土块表面覆盖遮阳网,以防止落叶等凋落物对实验的影响。实验设计如图 1 所示。每种实验处理进行 10 次重复。上述实验处理工作于 2015 年 1 月中旬全部完成。

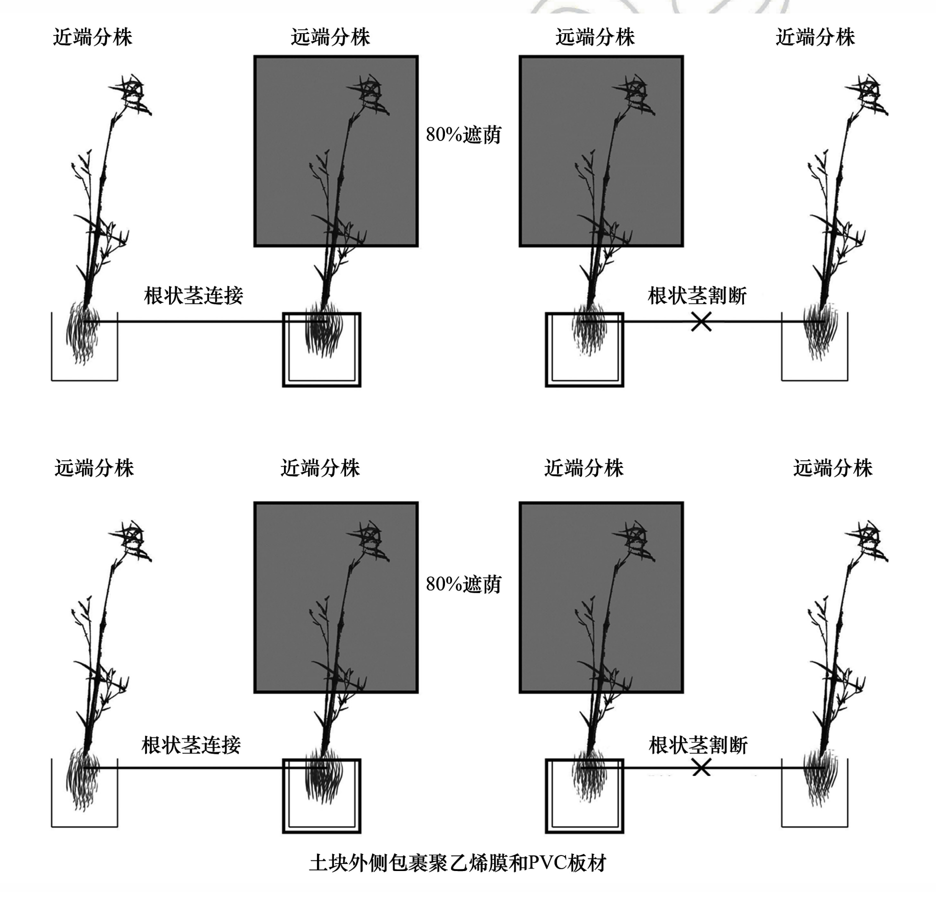


图 1　实验设计图

Fig.1　Schematic diagram of experiment design

2016 年 8 月 12 日,采用"抖根法"取得克隆片段内进行遮荫处理的白夹竹分株根际土壤[12-13],采集附着于根系表面约 4mm 以内的土壤作为根际土壤,并手工挑出其中的植物残体,过筛(<2mm)后储存于干燥灭菌

的自封袋中,并保存于-80℃超低温冰箱中备用。

1.3 土壤理化指标测定

根际土壤微生物生物量碳、氮(MBC or MBN)的测定采用氯仿熏蒸法(chloroform-fumigation extraction method with fumigation at atmospheric pressure, CFAP)[14]。用0.5mol/L K_2SO_4溶液对进行氯仿熏蒸处理以及未进行熏蒸处理的根际土壤进行浸提,浸提液过滤后通过 TOC/TN 分析仪(TOC-L analyzer, SHIMADZU, Japan)进行溶解性有机碳(DOC)以及溶解性有机氮(DON)含量的测定。微生物生物量的计算通过以下的公式进行计算[15]。

$$MBC(N) = 2.22 \times E_B$$

式中,E_B是进行氯仿熏蒸处理与未进行熏蒸处理的浸提液溶解性碳、氮含量差值。

N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖酶(N-acetyl-β-D-glucosaminidase,NAGase)活性采用 Parham 和 Deng[16]的方法进行测定,NAGase 活性表达为每克鲜土培养 1h 后释放的 ρ-nitrophenol 的微克数;脲酶(Urease)活性的测定根据 Kandeler 等[17]的方法,以尿素为底物,脲酶活性表达为每克干土在 37℃下培养 2h 后每毫升浸提液中水解氮的微克数。

1.4 土壤样本高通量测序

采用"GENEOUT 土壤 DNA 提取试剂盒"(LabGene,成都),按照操作说明提取土壤微生物基因组 DNA,并进行 1%凝胶电泳检测。引物 338F(5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3′)和 806R(5′-GGACTA CHVGGGTWTCTAAT-3′)被用来扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3、V4 可变区[18]。PCR 反应采用 20μL 反应体系:4μL 5× Fast Pfu buffer 溶液, 2μL 2.5 mmol/L dNTPs 溶液, 0.4μL 上游引物(5μmol/L)及 0.4μL 下游引物(5μmol/L), 0.4μL Fast Pfu polymerase 酶, 以及 10ng 模板 DNA,补足 ddH_2O 至 20μL。PCR 反应退火温度是 55℃。进行 PCR 反应的特异性引物需要包含以下特征:1)合适的 Illumina 接头序列使得 amplicons 与流动槽(flow cell)连接;2)一个 8bp 的标签序列(index sequence),如 barcode;3)特异性扩增上述目的片段[19]。同时为满足后续数据分析的准确性以及可靠性,PCR 反应尽可能采用少的循环数,并保证每个样本扩增的循环数一致。

每个样品 PCR 反应重复 3 次,将同一样本的 PCR 产物混合后用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测。Amplicons 采用 Axy Prep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)试剂盒进行纯化。扩增子用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统(Promega,USA)进行检测定量,纯化后的扩增产物进行等摩尔量混合。PhiX Contral library 与 Amplicons library 进行混合,然后在 Illumina Miseq platform (Majorbio, Shanghai, China)进行双端测序(paired-end sequence,2×300)。

1.5 数据与生物信息分析

采用单因素方差分析(one-way ANOVA)分析根状茎连接与割断处理对遮荫白夹竹分株根际土壤酶活性、DOC 和微生物生物量的影响。数据分析以及图表处理采用 SPSS 22 软件(SPSS, Chicago IL USA) 和 Origin Pro 9 软件 (OriginLab Corp., Massachusetts USA)完成。

Miseq 原始测序数据,根据标签序列将双端测序序列提取出来,进一步的 read 过滤处理包括:1)剔除引物序列;2)过滤 read 尾部质量值 20 以下的碱基,设置 50bp 大小的滑动窗口,若窗口内平均质量低于 20 从窗口开始截去后端碱基;3)移除小于 50bp 的 truncated reads[20]。经过剪切,去除掉存在引物错配、不确定碱基的序列;同时,根据 PE reads 之间的重叠关系,将成对的 reads 拼接成一条序列,重叠序列的最小长度为 10bp;拼接序列的 overlap 区允许的最大错配比率为 0.2,筛选不符合序列;根据序列首尾两端的 barcode 和引物区分样品,并调整序列方向,barcode 允许的错配数为 0,最大引物错配数为 2。经过质量控制、过滤的 Contigs 采用 QIIME(version 1.17)软件进行后续剪切、去复和分类学归类。对于优化后的 contigs 提取非重复序列,主要为了降低分析中间过程冗余计算量;去掉没有重复的单序列。按照 97%的相似性将非重复序列序列进行同源比对并聚类成可操作分类单元(OTU),聚类过程中通过 UCHIME 确认并剔除序列嵌合体,从而得到 OTU 代表

序列;然后将所有优化后的 contigs 映射到 OTU 代表序列,选出与 OTU 代表序列相似性在 97%以上的,归类到相应的 OTU 组别里[21]。然后,与数据库 Silva Release119(https://www.arb-silva.de/documentation/release-119)进行比对(uclust,identity 0.9)。

采用 Mothur (v1.12.1)软件制作稀释性曲线以确定测序数据深度以及合理性,并计算反应菌群多样性的香农指数(Shannon index)。基于样本 OTUs 的主成分分析(PCA)由 R 语言完成,并 Vegan 2.0 package 作 PCA 图。

2　研究结果

2.1　土壤性质

顶向处理组中,根状茎连接的遮荫远端分株具有比根状茎切断遮荫分株更高的根际土壤 DOC、MBC、MBN 含量,其中 MBC、MBN 含量差异显著(图 2);在基向处理组中,根状茎连接的近端分株遮荫后具有比根状茎割断处理的遮荫分株更高的 DOC、MBC 和 MBN 含量,差异均达到显著水平(图 2)。

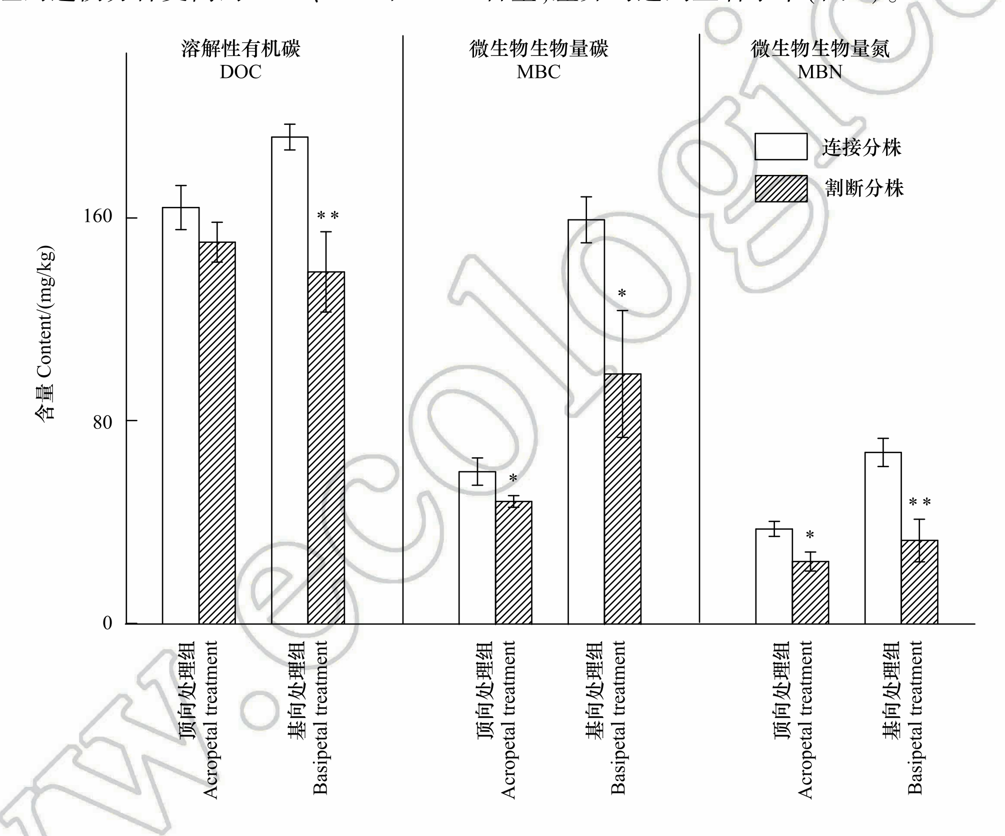


图 2　遮荫分株根际土壤溶解性有机碳(DOC),微生物生物量碳(MBC),微生物生物量氮(MBN)含量

Fig.2　Contents of DOC, MBC, MBN in the rhizosphere soil of shaded distal, proximal ramets

差异显著性依次为** $P<0.01$, * $P<0.05$

无论在顶向处理组还是基向处理组中,根状茎连接的遮荫分株较根状茎切断的遮荫分株具有更高的 NAGase、Urease 活性(图 3)。顶向处理组中,根状茎连接状态下的遮荫远端分株根际土壤的 NAGase 活性显著高于根状茎割断处理的遮荫远端分株,但这种显著性差异并没有在基向处理组中观测到;而对 Urease 活性来说,不论是顶向处理还是基向处理,差异均达到显著性水平(图 3)。

根状茎连接状态、同化产物传输方向以及二者交互作用对遮荫分株根际土壤特征的双因素方差分析结果如表 1 所示。根状茎连接状态(连接、断开)对遮荫分株根际土壤 DOC、微生物生物量、胞外酶活性均产生了显著性影响;遮荫分株根际土壤微生物生物量、Urease 活性显著则受到同化产物传输方向(顶向、基向)的显著影响;除 Urease 活性,根际土壤 DOC、微生物生物量、NAGase 活性均受到根状茎连接状态、同化产物传输方

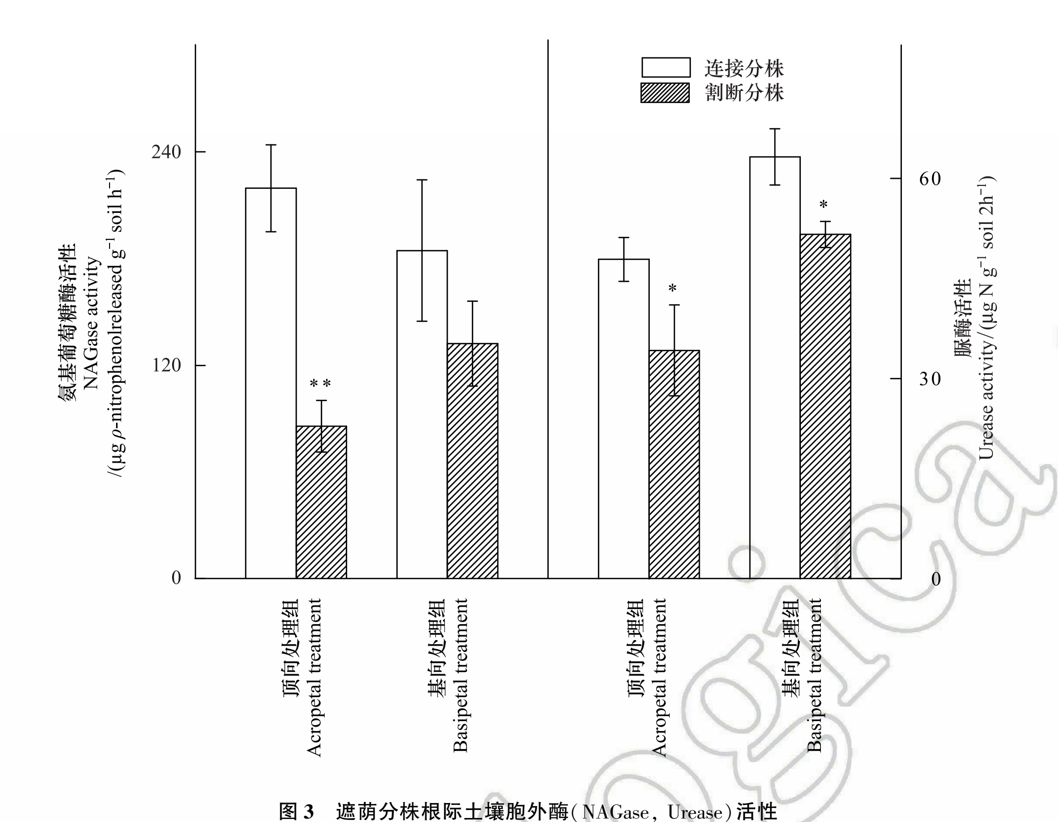


图 3　遮荫分株根际土壤胞外酶(NAGase, Urease)活性

Fig.3　Extracellular enzyme activities in the rhizosphere soil of shaded ramet

向以及二者交互作用的显著影响。

表 1　根状茎连接状态(连接、割断)、同化产物传输方向(顶向、基向)对遮荫分株根际土壤特征、土壤胞外酶活性的双因素方差分析结果

Table 1　Result of significance test for soil properties and soil enzyme activities in the rhizosphere soil of shaded, distal or proximal ramet. The effect of rhizome connection status (connected or severed), **direction of photosynthates transport** (acropetal transport or basipetal transport) **and their interaction were tested in two-way ANOVAs**

处理 Treatment	土壤特征 Soil properties			土壤胞外酶活性 Soil extracellular enzyme activities	
	DOC	MBC	MBN	NAGase	Urease
根状茎连接状态 Rhizome connection status	32.269**	21.281**	54.726**	35.028**	24.291**
同化产物传输方向 Direction of assimilates transport	1.867	90.613**	35.748**	0.13	40.78**
根状茎连接状态×同化产物传输方向 Rhizome connection status×Direction of assimilates transport	11.248*	9.728*	11.605**	6.698*	0.158

表中数字为 F 值,显著性检验表示为 ** $P<0.01$, * $P<0.05$; DOC:溶解性有机碳, dissolved organic carbon; MBC:微生物生物量碳, microbial biomass carbon; MBN:微生物生物量氮, microbial biomass nitrogen

2.2　Illumina Miseq 测序分析

通过 Illumina Miseq 测序,从 4 个处理各 3 个重复共 12 个土壤样品中总共得到了 556519 条序列和 18898 条可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。样本的 DNA 文库中包含 38478 到 55004 个不等的序列(reads),OTU 数目从 1244 到 1755 不等(表 2)。稀释性曲线达到平台期表明测序序列的数据量是合理的,意即样本产生再多数量的序列也对最终不同样本中的 OTUs 数目没有太大贡献[22]。本研究中的稀释性曲线表明,根状茎连接的白夹竹遮荫近端分株根际土壤(Sample 2)中的 OTUs 数量与其余样品之间存在较大差异;同时样品 4,8,9,3,11 与样本 1,12,5,6,7,10 之间 OTUs 数目存在微弱差异。但整体来看,所有的样本的 OTUs 数目差距不大(图 4,表 2),表明不同根状茎连接状态(割断,连接)的白夹竹遮荫分株(远端分株,近端分株)

根际土壤的 OTU 数目并不存在显著性差异。通过计算 α 多样性指数(Shannon index),发现克隆整合对白夹竹遮荫分株(远端分株,近端分株)根际土壤细菌群落多样性的影响并没有达到显著水平。

表 2　土壤样本 Miseq 测序结果以及采样区域的细菌多样性评估

Table 2　Miseq sequencing results of each soil sample and diversity estimates for each sampling site

土壤样品编号 Sample ID	测序结果 Sequencing results		多样性参数 Diversity estimates		
	原始序列 Reads	可操作分类单元 OTUs	ACE 丰度 ACE	Chao 物种丰度 Chao	香农指数 Shannon
1	44509	1592	1841	1844	6.06
2	43129	1244	1370	1412	6.15
3	42913	1672	1909	1944	6.26
4	41368	1755	1950	1973	6.45
5	51281	1545	1763	1770	6.01
6	38478	1530	1770	1752	5.95
7	54801	1493	1748	1776	5.94
8	43212	1702	1895	1905	6.39
9	48047	1704	1939	1949	6.28
10	55004	1427	1627	1651	6.13
11	46386	1659	1857	1873	6.32
12	47391	1575	1793	1853	6.11

编号 1—3:土样来自基向处理组根状茎连接的遮荫近端分株;编号 4—6:土样来自基向处理组根状茎断开的遮荫近端分株;编号 7—9:土样来自顶向处理组根状茎连接的遮荫远端分株;编号 10—12:土样来自顶向处理组根状茎割断的遮荫远端分株

序列比对结果表明,所有土壤样本的 OTUs 归属于13 个门(phylum),419 个属(genus)(相对丰度低于 1%的菌群归于 others 组中)(图 5,图 6,表 2)。其中变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、酸杆菌门(Acidobacteria)在所有样品均占据较大比重。热孢菌门(Thermotogae)细菌仅在顶向处理组的白夹竹遮荫分株根际土壤中被发现,在基向处理组则未发现。

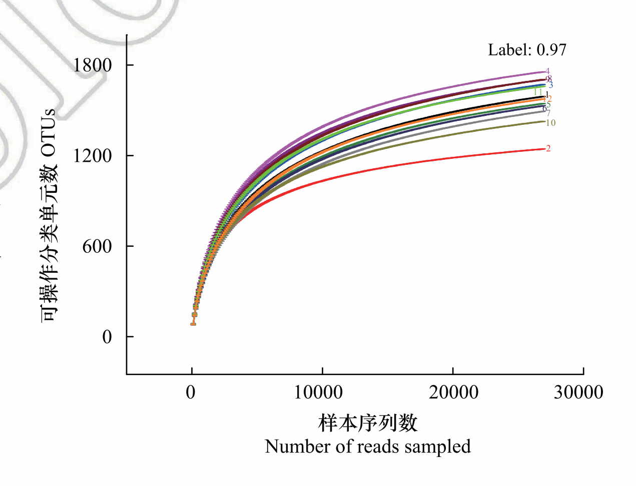


图 4　所有样本基于 OTU 数目的稀释性曲线(97%相似度)

Fig.4　Rarefaction curves of the OTU number at 97% similarity for every soil sample

Xanthobacteraceae(uncultured)包含一属 *Azorhizobium*,具有共生固氮能力,其在顶向处理组中最大丰度为2.05%,在基向处理组中最大丰度为 2.99%(图 5,图6)。另一种固氮菌属 *Bradyrhizobium*,相对丰度最高为3.07%。*Nitrosomonadaceae*(uncultured)隶属 β-变形菌纲,该科包含的亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)以及亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)土壤细菌调控着铵盐向亚硝酸盐转化的氨氧化过程,是土壤生态环境中重要的氨氧化细菌(AOB)[23]。本研究中,顶向处理组中其相对丰度从 1.17% 到 3.96%,而基向处理组中其相对丰度较高(2.43%—11.80%)(图 5,图 6)。

在所有的土壤样品均检测出了硝化螺菌门(Nitrospirae)的土壤微生物,相对丰度 1.77%—7.83%不等(图5,表 3)。该门仅包含一单科硝化螺菌科(Nitrospiraceae),该科的硝化螺菌属(*Nitrospira*)可将亚硝酸盐转化成硝酸盐,是 N 素循环过程中重要的硝化细菌[24]。顶向处理组中, *Nitrospira* 相对丰度从 0.77%到 2.71%,基向处理组中其相对丰度从 1.76%到 5.63%不等(图 5,图 6)。*Nitrospinaceae*(uncultured)在土壤样品 2 中发现(相对丰度 1.41%)(图 6)。*Nitrospira* 和 *Nitrospinaceae* 均是重要的亚硝酸盐氧化细菌(NOB)[25]。

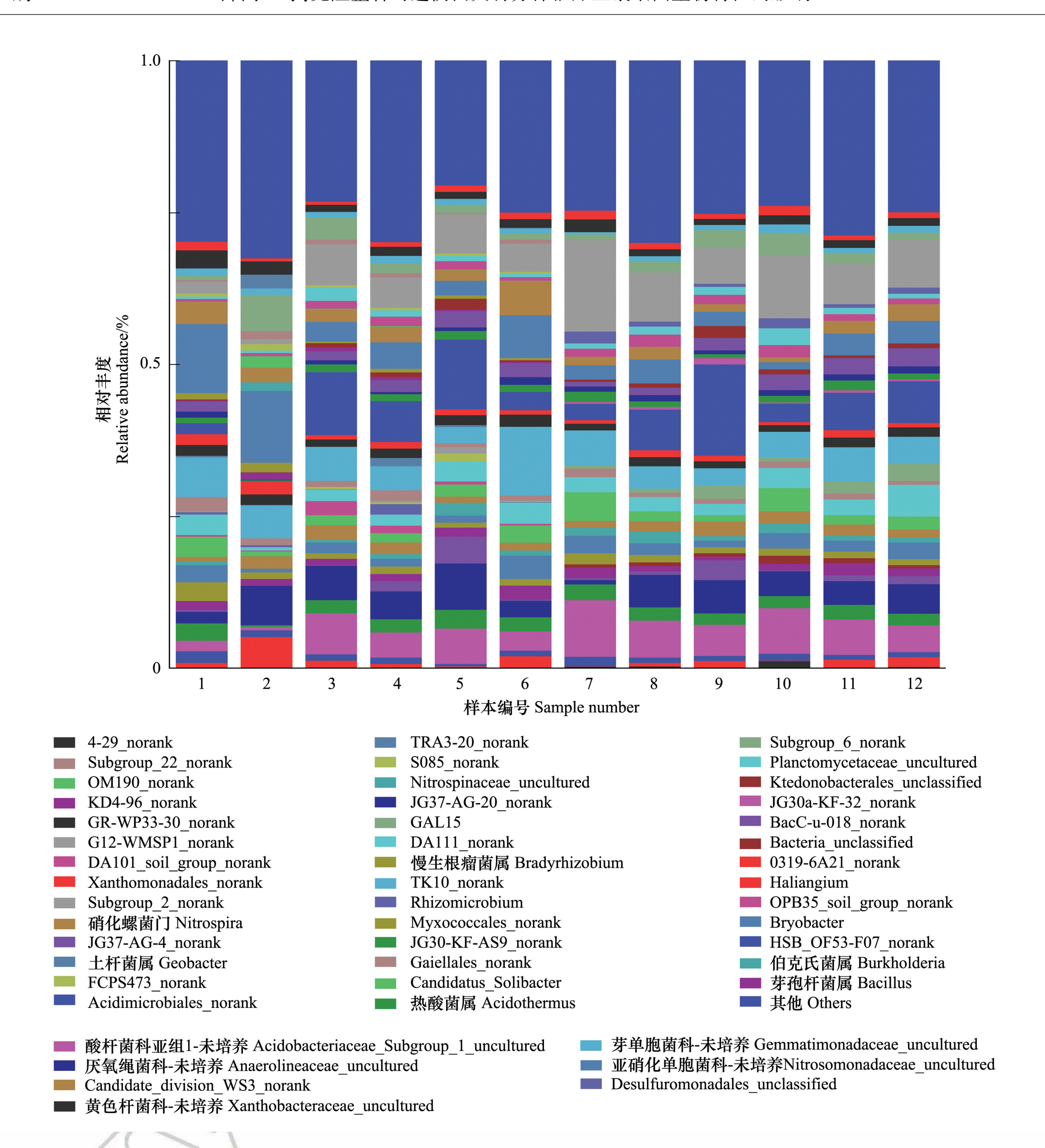


图 5　土壤样本基于属水平的细菌群落组成

Fig.5　Bacterial community composition of soil samples based on relative abundance at genus level

3　讨论

光合产物等物质在克隆分株间的运输(顶向、基向传输)对克隆植物生长有着重要生态意义,特别是处于资源异质性斑块下的克隆植物[26]。已有研究表明,生长在适宜生境斑块的克隆分株会传输新形成的同化产物给生境条件相对恶劣斑块中的分株,以缓解其受到限制的光合能力或养分摄取能力[27]。本研究中,根状茎连接的遮荫分株根际土壤较高的 DOC 含量,表明克隆整合提高了白夹竹遮荫分株根际土壤的 C 有效性,暗示了白夹竹分株间克隆整合的存在。在树木环割实验中,由于新形成的光合产物向根系的传输被打断,从而削弱了根际沉积[28]。克隆整合对易分解碳的影响与环割实验的影响是相似的,即根状茎割断处理的遮荫分株(远端分株,近端分株)根际土壤的 DOC 以及 MBC 明显降低。同样地,先前的一项匍匐茎草本克隆植物的研

究也取得了相似的结果[29]。

土壤微生物产生的胞外酶(如纤维素酶、木质素酶等)能调控土壤有机质降解、转移和矿化等过程[30]。NAGase 参与的壳多糖水解[31],是土壤中有机碳的重要来源之一[32]。细菌和真菌均可以产生 NAGase[16]。Urease 主要由细菌、丝状真菌以及酵母菌产生,其在 N 素矿化过程中起着重要作用[33-34]。因此,相比割断分株,克隆整合导致的遮荫分株(远端分株,近端分株)根际土壤较高的微生物生物量(MBC、MBN)可能是上述两种水解酶活性增强的重要原因。同时,根状茎连接状态、同化产物传输的方向性对土壤胞外酶显著影响表明克隆整合的方向性对土壤有机质降解可能产生不同的影响(表 1),个中机制则需更多研究证明。

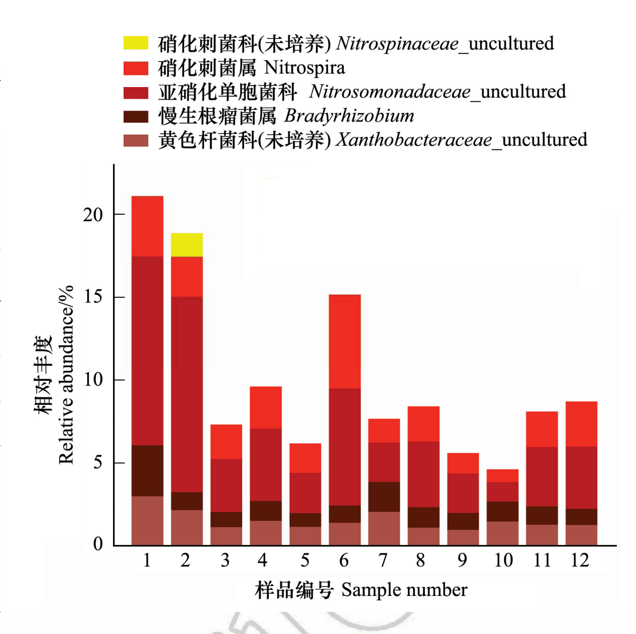


图 6 土壤样本中,与 N 素转化相关的细菌功能群的相对丰度

Fig.6 Relative abundance of bacterial functional group associated with N turnover in soil samples

主成分分析(PCA)作为一种对原有的复杂数据降维、简化、分析的技术,是分析环境微生物群落结构变化的重要手段[35]。基于 OTU 水平的 PCA 分析表明,无论是在顶向处理中还是在基向处理中,根状茎连接处理与割断处理下的遮荫分株根际土壤拥有相似的细菌群

图 7 基于属水平的土壤细菌群落组成的主成分分析图

Fig.7 Microbial community composition described by principal component analysis (PCA) based on genus level information

表 3　基于门水平相对丰度的土样样品细菌群落组成

Table 3　Bacterial community composition of soil samples based on relative abundance at phylum level

分类 Taxon	土壤样品编号 Sample ID											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
酸杆菌门 Acidobacteria	0.124289	0.128972	0.250771	0.171827	0.194202	0.183981	0.367403	0.234566	0.199071	0.310351	0.213789	0.212154
放线菌门 Actinobacteria	0.117859	0.062107	0.063817	0.080989	0.055826	0.064672	0.082363	0.062888	0.059208	0.059022	0.067162	0.051552
Bacteria_unclassified							0.005054	0.005687	0.005315	0.013046	0.007805	0.004943
拟杆菌门 Bacteroidetes	0.020182	0.025237	0.008214	0.01628	0.014347	0.011782	0.014532	0.016019	0.010667	0.006504	0.00368	0.014421
Candidate_division_WS3	0.007471	0.020442	0.024419	0.01903	0.010258	0.012303	0.011076	0.017246	0.023899	0.019885	0.018101	0.01312
绿弯菌门 Chloroflexi	0.106188	0.120275	0.248653	0.222933	0.357443	0.136703	0.090466	0.207173	0.346701	0.170749	0.205315	0.222078
厚壁菌门 Firmicutes	0.024456	0.016651	0.016131	0.023416	0.02375	0.037577	0.027764	0.016837	0.01089	0.015982	0.027876	0.023304
芽单胞菌门 Gemmatimonadetes	0.075005	0.064709	0.061215	0.043598	0.031778	0.123397	0.066307	0.041405	0.031741	0.05066	0.060398	0.048244
硝化螺菌门 Nitrospirae	0.045902	0.078387	0.038766	0.035532	0.024717	0.077272	0.017691	0.030106	0.024419	0.020405	0.035161	0.045642
浮霉菌门 Planctomycetes	0.009664	0.043152	0.032968	0.018993	0.015164	0.009775	0.012488	0.026686	0.023416	0.037577	0.017878	0.017357
变形菌门 Proteobacteria	0.439101	0.414644	0.176733	0.297045	0.223267	0.307712	0.249953	0.278573	0.201301	0.221148	0.288051	0.282252
Thermotogae							0.005500	0.00669	0.022115	0.006839	0.020182	0.028248
疣微菌门 Verrucomicrobia	0.008065	0.008363	0.03661	0.030329	0.020628	0.009961	0.015722	0.030143	0.022933	0.026129	0.020071	0.014793
其他 Others	0.021818	0.01706	0.041702	0.04003	0.028619	0.024865	0.033674	0.02598	0.018324	0.041702	0.014533	0.021892

落结构。先前关于匍匐茎克隆植物 *Glechoma longituba* 生理整合的研究结果表明,克隆整合显著改变了遮荫分株根际土壤微生物群落组成,进而促进了根际生物过程[25,36]。而我们的研究结果与之不同。根际土壤 C 投入将会导致土壤有机质周转、微生物活性的短期变化[37],而土壤微生物群落种类多、数量大,土壤生态系统似乎存在一定程度的功能冗余(redundancy of function),如,微生物多样性与有机质降解之间并不存在直接的联系。某种土壤微生物数量的削减对特定的土壤生物过程造成的影响微乎其微,因为其他土壤微生物可能也执行这种功能[38]。这种功能冗余可能作为一种保障策略(insurance hypothesis),在不稳定的生态系统中,这些"冗余"物种可能起到维持系统生态平衡的作用[39]。因此,功能"冗余种"的存在可能使得土壤细菌群落保持较高的稳定性[40-41](resilience of soil microbial community),从而造成土壤细菌群落对克隆整合造成的根际土壤 C 投入响应"迟钝"。这是一种可能性的解释,而针对特定细菌功能群多样性的研究可能会提供进一步的实验证据。同时,相比传统指纹图谱(DGGE,PLFA)技术,单个样本的高测序通量及各分类水平上的高灵敏度使得高通量测序在环境微生物研究中发挥着越来越重要的作用[42]。虽然,高通量测序在广度、深度及分辨率上提高了多样性分析水平,并能够从整体群落层次上分析微生物遗传多样性[43]。但是,高通量测序得到的海量的序列数据可能不利于清晰阐释不同生态过程下的微生物群落结构的差异[11],这可能是本研究中克隆整合作用并没有对根际土壤细菌群落结构产生显著性影响的另一种解释。

克隆整合显著促进了白夹竹遮荫分株(远端分株,近端分株)的根际土壤 C 有效性,进而提高了根际微生物生物量。高通量测序能够较为全面、准确地反映根际细菌数量、活性变化影响的土壤细菌群落结构,并能够从整体细菌群落水平反映生物多样性。海量的序列数据可能不利于清晰阐释不同生态过程下的微生物群落结构差异。微生物多样性与土壤生态系统功能实现间关联研究的重点在于探讨多样性与微生物群落结构之间的关系以及群落结构与功能之间的关系[44]。因此,特定功能群(specific functional group)的定量化与高通量测序相结合,靶定丰度较低但发挥至关重要功能的微生物种群,可能为微生物生态学的研究提供新的思路。

致谢:感谢四川农业大学风景园林学院刘光立老师、小麦所彭远英老师在后期数据分析中提供的帮助。

参考文献(References):

[1] 董鸣. 克隆植物生态学. 北京:科学出版社, 2011:1-20.

[2] Stuefer J F. Potential and Limitations of Current Concepts regarding the Response of Clonal Plants to Environmental Heterogeneity. Plant Ecology, 1996, 127(1):55-70.

[3] Kuzyakov Y. Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2002, 165(4):382-396.

[4] Rajaniemi T K, Allison V J. Abiotic conditions and plant cover differentially affect microbial biomass and community composition on dune gradients. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(1):102-109.

[5] Sinsabaugh R L, Antibus R K, Linkins A E. An enzymic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. Agriculture Ecosystems and Environment, 1991, 34(1/4):43-54.

[6] Sinsabaugh R L. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(3):391-404.

[7] Aon M A, Colaneri A C. II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. Applied Soil Ecology, 2001, 18(3):255-270.

[8] 蒋婧, 宋明华. 植物与土壤微生物在调控生态系统养分循环中的作用.植物生态学报, 2010, 34(8):979-988.

[9] Torsvik V, Sørheim R, Goksøyr J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities—A review. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1996, 17(3/4):170-178.

[10] 周琳, 张杰. 群落分析中的 16S rRNA 及其基因 16S rDNA 优化扩增. 微生物学报, 2010, 50(1):7-14.

[11] 夏围围, 贾仲君. 高通量测序和 DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价. 微生物学报, 2014, 54(12):1489-1499.

[12] 刘波, 胡桂萍, 郑雪芳, 张建福, 谢华安. 利用磷脂脂肪酸(PLFAs)生物标记法分析水稻根际土壤微生物多样性. 中国水稻科学, 2010, 24(3):278-288.

[13] Fujii Y, Furubayashi A, Hiradate S. Rhizosphere soil method: a new bioassay to evaluate allelopathy in the field. //Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy, "Establishing the Scientific Base", New South Wales, Australia: Charles Sturt University, 2005:490-492.

[14] Witt C, Gaunt J L, Galicia C C, Ottow J C G, Neue H U. A rapid chloroform-fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. Biology and Fertility of Soils, 2000, 30(5/6):510-519.

[15] Wu J, Joergensen R G, Pommerening B, Chaussod R, Brookes P C. Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction—an automated procedure. Soil Biology and Biochemistry, 1990, 22(8):1167-1169.

[16] Parham J A, Deng S P. Detection, quantification and characterization of β-glucosaminidase activity in soil. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(8/9):1183-1190.

[17] Kandeler E, Gerber H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. Biology and Fertility of Soils, 1988, 6(1):68-72.

[18] Dennis K L, Wang Y W, Blatner N R, Wang S Y, Saadalla A, Trudeau E, Roers A, Weaver C T, Lee J J, Gilbert J A, Chang E B, Khazaie K. Adenomatous polyps are driven by microbe-instigated focal inflammation and are controlled by IL-10 producing T-cells. Cancer Research, 2013, 73(19):5905-5913.

[19] Li Z P, Zhang Z G, Xu C, Zhao J B, Liu H L, Fan Z Y, Yang F H, Wright A D G, Li G Y. Bacteria and methanogens differ along the gastrointestinal tract of Chinese roe deer (*Capreolus pygargus*). PLoS One, 2014, 9(12):e114513.

[20] Fadrosh D W, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman R M, Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. Microbiome, 2014, 2:6.

[21] Hong C, Si Y X, Xing Y, Li Y. Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(14):10788-10799.

[22] Amato K R, Yeoman C J, Kent A, Righini N, Carbonero F, Estrada A, Gaskins H R, Stumpf R M, Yildirim S, Torralba M, Gillis M, Wilson B A, Nelson K E, White B A, Leigh S R. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. The ISME Journal, 2013, 7(7):1344-1353.

[23] Bernhard A E, Donn T, Giblin A E, Stahl D A. Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system. Environmental Microbiology, 2005, 7(9):1289-1297.

[24] Lücker S, Wagner M, Maixner F, Pelletier E, Koch H, Vacherie B, Rattei T, Damsté J S S, Spieck E, Paslier D L, Daims H. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(30):13479-13484.

[25] 闫媛, 黎力, 王亚宜, 林喜茂, 马骁, 陈玉. 采用高通量测序分析全程自养脱氮(CANON)系统不同脱氮效能下的微生物群落结构. 北京工业大学学报, 2015, 41(10):1485-1492.

[26] Saitoh T, Seiwa K, Nishiwaki A. Importance of physiological integration of dwarf bamboo to persistence in forest understorey: a field experiment. Journal of Ecology, 2002, 90(1):78-85.

[27] Saitoh T, Seiwa K, Nishiwaki A. Effects of Resource Heterogeneity on Nitrogen Translocation within Clonal Fragments of *Sasa palmata*: an Isotopic (^{15}N) Assessment. Annals of Botany, 2006, 98(3):657-663.

[28] Chen D M, Zhou L X, Wu J P, Hsu J, Lin Y B, Fu S L. Tree girdling affects the soil microbial community by modifying resource availability in two subtropical plantations. Applied Soil Ecology, 2012, 53(1):108-115.

[29] Chen J S, Li J, Zhang Y, Zong H, Lei N F. Clonal integration ameliorates the carbon accumulation capacity of a stoloniferous herb, *Glechoma longituba*, growing in heterogenous light conditions by facilitating nitrogen assimilation in the rhizosphere. Annals of Botany, 2015, 115(1):127-136.

[30] Schimel J P, Weintraub M N. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(4):549-563.

[31] Sinsabaugh R L, Antibus R K, Linkins A E, McClaugherty C A, Rayburn L, Repert D, Weiland T. Wood Decomposition: Nitrogen and Phosphorus Dynamics in Relation to Extracellular Enzyme Activity. Ecology, 1993, 74(5):1586-1593.

[32] Smucker R A, Kim C K. Chitinase induction in an estuarine system// Llewellyn GC, O'Rear CE, eds. Biodeterioration research. New York: Plenum Press, 1987:347-355.

[33] Gianfreda L, Rao M A, Piotrowska A, Palumbo G, Colombo C. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. Science of the Total Environment, 2005, 341(1/3):265-279.

[34] Mobley H L, Hausinger R P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. Microbiological Reviews, 1989, 53(1):85-108.

[35] Wang Y, Sheng H F, He Y, Wu J Y, Jiang Y X, Tam N F Y, Zhou H W. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of Illumina tags. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(23):8264-8271.

[36] Lei N F, Li J, Ni S J, Chen J S. Effects of Clonal Integration on Microbial Community Composition and Processes in the Rhizosphere of the

Stoloniferous Herb *Glechoma longituba* (Nakai) Kuprian. PLoS One, 2014, 9(9):e108259.

[37] Kuzyakov Y, Friedel J K, Stahr K. Review of mechanisms and quantification of priming effects. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(11/12): 1485-1498.

[38] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M T, Landi L, Pietramellara G, Renella G. Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Science, 2003, 54(4):655-670.

[39] Loreau M, Naeem S, Inchausti P, Bengtsson J, Grime J P, Hector A, Hooper D U, Huston M A, Raffaelli D, Schmid B, Tilman D, Wardle D A. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. Science, 2001, 294(5543): 804-808.

[40] Griffiths B S, Philippot L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. Fems Microbiology Reviews, 2013, 37(2): 112-129.

[41] Cruzmartínez K, Suttle K B, Brodie E L, Power M E, Andersen G L, Banfield J F. Despite strong seasonal responses, soil microbial consortia are more resilient to long-term changes in rainfall than overlying grassland. The ISME Journal, 2009, 3(6):738-744.

[42] 楼骏, 柳勇, 李延. 高通量测序技术在土壤微生物多样性研究中的研究进展. 中国农学通报, 2014, 30(15):256-260.

[43] 姬洪飞, 王颖. 分子生物学方法在环境微生物生态学中的应用研究进展. 生态学报, 2016, 36(24):8234-8243.

[44] O'Donnell A G, Seasman M, Macrae A, Waite L, Davies J T. Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. Plant and Soil, 2001, 232(1/2): 135-145.

